

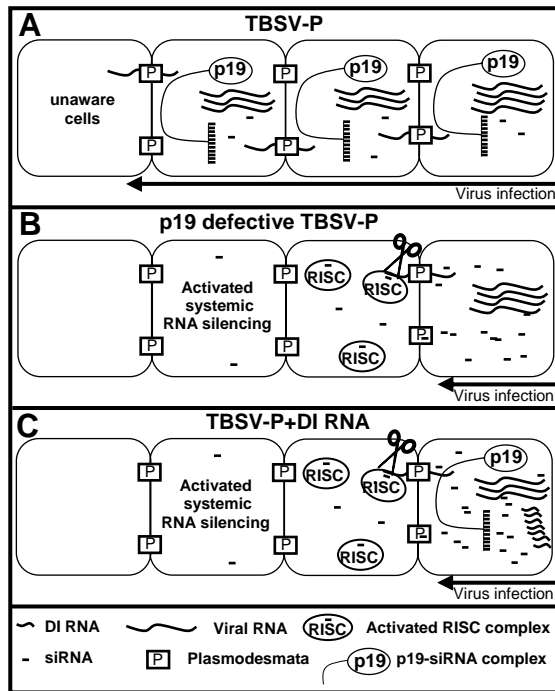
Zárójelentés OTKA T38313

Kísérleteink során célul tűztük ki, hogy megértsük a vírus fertőzés hatására indukálódó transzkripciót követő RNS interferencián (post-transcriptional gene silencing (PTGS)) alapuló védekezési rendszer működését. Analizáljuk a vírus fertőzés és a tünetek kialakulása során indukálódó génexpressziós változásokat és vizsgáljuk az ún. „shut off” mechanizmust.

1. Kísérleteinkben beállítottuk az *in situ* hibridizálás technikáját vírus fertőzött növényekre. *In situ* hibridizálással illetve immunofestéssel vizsgáltuk a vad típusú és PTGS szuppresszor (a vírus p19-es fehérjéje, amely képes az RNS interferencia működését gátolni) mutáns vírussal fertőzött növényekben a vírus eredetű fehérjék és RNS felhalmozódást. Eredményeink megmutatták, hogy szuppresszor hiányában a fertőzött növényben aktiválódó PTGS képes a vírus elterjedését megakadályozni de nem képes a vírus replikációt gátolni azokban a sejtekben ahova a vírus már bejutott (**Havelda és mtsai., 2003**). Eredményeink arra utaltak, hogy a vírus fertőzés esetén a vírus replikáció hatására a PTGS szignál molekulákat generál amelyek a vírus fertőzési frontot megelőzve felkészítik a nem fertőzött sejteket a vírus invázióra specifikusan aktiválva a PTGS-t. Az ilyen sejtekbe jutó vírust a sejt azonnal lebontja megakadályozva a replikáció beindulását. A vírus által kódolt szuppresszor fehérje feladata feltehetően a mobil szignál elfogása ezzel megakadályozva a PTGS szisztemikus aktiválódást, így a vírus képes az egész növényt előzőlni. A kapott eredmények azt mutatják, hogy a vírusherjedés lefolyásában a tünetek kialakulásában és feltehetőleg a gazda génexpressziós rendszerében lezajló változásokban a fertőzés hatására aktiválódó szignalizációs események döntő szerepet játszanak. A továbbiakban kísérleteket állítottunk be e szignalizációs események megértésre illetve a szignál természetének megismerésére. Az eredményeink tehát arra utaltak hogy a vírus fertőzés során szignalizációs események játszódnak le a fertőzött és a vírus által még nem fertőzött szövet részek között. A vírus fertőzés sikere döntően attól függ, hogy a vírus képes e megakadályozni a növény RNS csendesítésen alapuló védekezési rendszerének aktiválódását. Eredményeink az mutatták, hogy tombusvírusok esetében a vírus által kódolt RNS csendesítés gátló fehérje (p19) megakadályozza egy szignál molekula kialakulását/mozgását, amely képes lenne szekvencia specifikusan aktiválni az RNS csendesítés mechanizmusát a vírus fertőzési frontot megelőzve.

A fertőzési front előtt aktiválódó RNS csendesítési mechanizmus képes megállítani a fertőzési folyamatot a vírus RNS specifikus degradációjával. Ezt a jelenséget tapasztaljuk az RNS csendesítés gátló fehérje hiány mutáns vírus fertőzése esetén. Adataink azt mutatják, hogy vírus fertőzés hatására lezajló szignalizációs jelenségek megértése alapvető a fertőzésben és a védekezésben szerepet játszó gazda komponensek azonosításhoz és megértéséhez. A kísérleteink eredményeit egy hipotetikus szignál molekula működésével tudtuk magyarázni. Azonban a szignál fizikai természetéről nincsenek információink. A kutatócsoportban intenzíven vizsgáljuk a vírus által kódolt RNS csendesítés gátló fehérje működését. Az általunk vizsgált jelenség alapvető jelentőségű a vírusok által indukált gén expressziós változások azonosításában és értelmezésében is ezért további erőfeszítéseket tettünk a RNS csendesítés szignalizáció és a tünetek kialakulása közötti kapcsolat további vizsgálatára. Az RNS csendesítés mechanizmusának megértéséhez fontos adatokat szolgáltathat egy másik rendszer. A tombusvírusok társulhatnak defektív interferáló (DI) RNS-ekkel, amelyek jelenlétében a fertőzött növény a RNS csendesítés gátló fehérje hiány mutáns vírus fertőzéséhez hasonló tüneteket mutat, vagyis a kezdeti fertőzés során kialakuló tünet együttes megjelenése után a növény mintegy kigyógyul a fertőzésből és tünetmentesen vagy csak enyhe tüneteket mutatva tovább fejlődik. Ezzel a jelenséggel ellentétben a vad típusú vírusherélés nekrozishoz és a növény pusztuláshoz vezet egy héten belül. *In situ* hibridizációs kísérleteink megmutatták, hogy ez a hasonlóság igaz szöveti szinten is. Reményeink szerint ennek a rendszernek a vizsgálata további adatokat szolgáltat az RNS csendesítés mechanizmusának és a DI RNS-ek tünet módosító hatásának működésére. Adataink arra utaltak hogy a vírus fertőzés során szignalizációs események játszódnak le a fertőzött és a vírus által még nem fertőzött szövet részek között. A vírus fertőzés sikere döntően attól függ, hogy a vírus képes e megakadályozni a növény RNS csendesítésen alapuló védekezési rendszerének aktiválódását. Eredményeink az mutatták, hogy tombusvírusok esetében a vírus által kódolt RNS csendesítés gátló fehérje megakadályozza egy szignál molekula kialakulását/mozgását, amely képes lenne szekvencia specifikusan aktiválni az RNS csendesítés mechanizmusát a vírusherélési frontot megelőzve. A hipotetikus szignál molekula minősége azonban rejtve maradt. Az RNS csendesítéssel társult szignál molekula azonosításához a tombusvírusokkal társult defektív interferáló (DI) RNS-eket használtuk fel. A DI RNS-ek jelenlétében a fertőzött növény az RNS csendesítés gátló fehérje hiány mutáns vírus fertőzéséhez hasonló tüneteket mutat. *In situ* hibridizációs kísérleteink megmutatták, hogy ez a hasonlóság igaz szöveti szinten is. Biokémiai vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a DI RNS-ek az RNS csendesítés gátló fehérje gátlásával érik el tünetcsökkentő hatásukat.

Eredményeink arra utalnak, hogy a szignalizációért felelős molekula az RNS csendesítés mechanizmusával társult 21-23 nt hosszágú rövid interferáló (si) RNS molekula (1. Ábra). Eredményeinket a szakterület vezető folyó iratában közzeltük le (**Havelda és mtsai., 2005**).



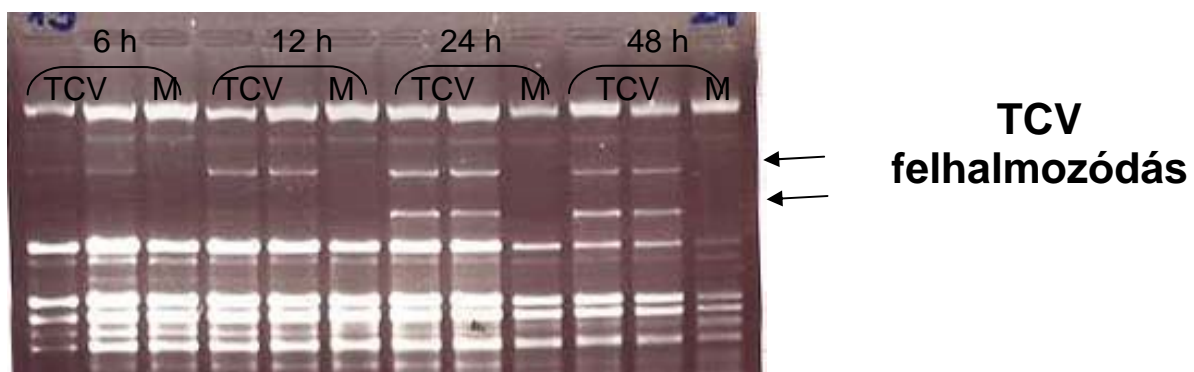
1. Ábra Növényben vírus fertőzésre aktiválódó PTGS alapú védekezés modellje.

A. A vad típusú vírus fertőzés során a sejtben sok siRNS keletkezik a gazda PTGS alapú rendszere által. A keletkezett siRNS-eket azonban rögtön megkötö a vírus p19-es PTGS szuppresszor fehérjéje így a siRNS-ek nem képesek elmozdulni a sejtből. **B.** A p19 mutáns vírus fertőzés esetén a p19-es fehérje hiányában a keletkezett siRNS-ek átjutnak a még nem fertőződött sejtetekbe és aktiválják a PTGS-t, amels a vírus elterjedésének megakadályozásához vezet. **C.** DI RNS jelenlétében a DI RNS-ről olyan nagy mennyiségű siRNS keletkezik, amely telíti a p19-et és a maradék szabad siRNS a p19 defektív mutánshoz hasonló jelenségeket indukál.

A munkánk időszerűségét tükrözi, hogy eredményeinket áttekintő publikácóként (review) is publikálhattuk (**Simon és mtsai., 2004**).

2. A kísérletek második csoportjában kísérletet tettünk szinkronizált fertőzés megteremtésére. Szinkronizált vírus fertőzési rendszer megteremtése alapvető fontosságú, hogy elkülöníthessük a sejszintű és szignalizáció által indukált gazda válaszokat. Létrehoztuk a kísérleteinkhez szükséges bináris vektorba klónozott fertőzőképes vad típusú és mutáns (post-transcriptional silencing (PTGS) szuppresszor defektív) vírust hordozó konstrukciókat. Az

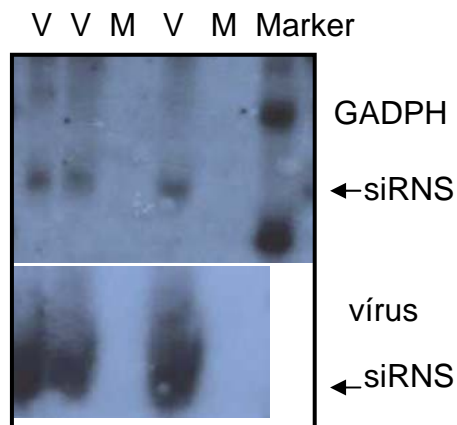
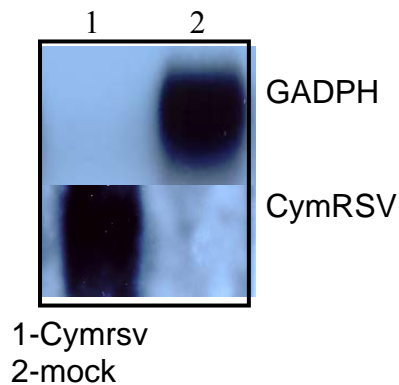
elkészített konstrukciókkal agroinfiltráció segítségével szinkronizált fertőzéseket hoztunk létre *Nicotiana benthamiana* levelekben. Az infiltrációs kísérletek eredményei megmutatták, hogy ez az eljárás alkalmas nagy tömegű szinkronizált fertőzést mutató kísérleti anyag létrehozására. Az eljárás hátrányaként mutatkozott, hogy az agroinfiltrálási eljárás együtt jár a PTGS rendkívül erős aktiválódásával az infiltrált szövetben, ami a vírus replikációs folyamatának elnyúlásához vezetett, szemben a természetes rendszerekre jellemző gyors invazív replikációval. Ezt a jelenséget mérsékelni tudtuk az infiltrációs kísérletek alacsonyabb hőmérsékleten történő végrehajtásával, ugyanis alacsonyabb hőmérsékleten a PTGS kevésbé hatékonyan működik. Összefoglalva az agroinfiltrációs fertőzés alkalmas a szinkronizált fertőzés létrehozásához, azonban az említett hátrány hatásának kiszűrésére egy alternatív a protoplastok transzfekcióján alapuló alternatív szinkronizált fertőzési rendszer kidolgozást is megkezdtük. *N. benthamiana* protoplastokat fertőztünk vad és mutáns vírusokkal, majd különböző időpontokban mintát vettünk. Az egész növény szintű válaszok vizsgálatához vad és mutáns vírusokkal fertőzött szövetekből mintákat vettünk és ezeket a mintákat cDNS AFLP-vel vizsgáltuk. A két rendszerből nyert adatok összehasonlítása lehetővé teszi a kapott adatok pontosabb értelmezését. A *N. benthamiana* rendszer hátránya, hogy nem áll adatbázis a háttérben, amely lehetővé tenné a kapott adatok gyors és megbízható azonosítását. Sajnálatos módon a cDNS AFLP rendszerben kapott eredményeink rendkívül megbízhatatlanok voltak, sok nem valós eredményt kaptunk. A cDNS AFLP technika problémái miatt az alternatív protoplast transzfekción alapuló technológiát kiterjesztettük *Arabidopsis thaliana* protoplastokra is, és beállítottuk a hatékony transzfektálási rendszert (2. Ábra).



2. Ábra Turnip crinicle virus (TCV) felhalmozódása *Arabidopsis* protoplastokban. Már 6 óra elteltével is jól látható az EtBr-dal festett gélen a vírus felhalmozódása.

Az *Arabidopsis* alapú rendszer nagy előnye, hogy a genom szekvenálási programoknak köszönhetően van informatikai háttér a kapott adatok feldolgozásához. Az MBK-ban hamarosan egy DNS chip labor fog felállni, amely lehetővé teszi mintáink microarray chippen történő vizsgálatát, és így valóban átfogó képet kaphatunk a génexpressziós változásokról. A szinkronizált fertőzés másik lehetőségeként létrehoztunk egy olyan konstrukciót, ahol alkohol indukálható promóter mögé építettük a vírus biológiailag aktív klónját majd ezzel a konstrukcióval *N. benthamiana* növényeket transzformáltunk. Azonban feltehetően a promóter „leaky” volta miatt nem tudtunk transzformáns növényeket előállítani. A növényben, vírussal fertőzés hatására kialakuló komplex változások azonosításához vad típusú és mutáns vírus cDNS klónjáról nyert in vitro RNS-el *N. benthamiana* leveleket fertőztünk majd a levelekből mintákat szedtünk, amelyeket a további vizsgálatok során fel fogunk használni a cDNS AFLP kísérletekhez. A kísérleteink során azonosítottunk egy endogén gént (*glicerinaldehid foszfát dehidrogenáz, GAPDH*), amely gyakorlatilag teljes „shut off” jelenséget mutatott tobuszvírussal fertőzött *N. benthamianában*. Ez a felfedezés nagyban megkönnyítheti a „shut off” molekuláris hátterének feltárását. Előzetes eredményeink arra utalnak, hogy a PTGS-nek kulcs szerepe van a ebben a mechanizmusban mert a vírus fertőzés hatására a PTGS-el asszociálódó un. kis interferáló (siRNS) RNS-eket sikerült kimutatnunk a *GAPDH* m RNS-éről (3. Ábra).

3. A vírusok által okozott tünetek molekuláris hátterének felderítése szintén célkitűzéseink közé tartozik. A DI RNS rendszer és különböző helper vírusok (különböző a *Tombusviridae* nemzetségbe tartozó vírusok) segítségével külön tudtuk választani a PTGS illetve a DI RNS másodlagos szerkezetéhez köthető, a nekrozis kialakulásáért felelős, funkciókat (**Hornyik és mtsai. 2005**). A legújabb irodalmi adatok megmutatták, hogy a vírus fertőzés hatására kialakuló tünetek megjelenésében a micro RNS-ek (miRNS) expressziós szintjének megváltozása illetve miRNA biogenezis útvonal megzavarása alapvető szerepet játszik. Mivel a miRNS-ek rendkívül rövidek (21-26 nukleotid) és kimutatásuk rendkívül nehéz, kísérleteink során célul tűztük ki egy hatékony miRNS detektáló rendszer kialakítást (**Váloczi és mtsai., 2004**). Ezzel a rendszerrel tervezzük a vírussal fertőzés hatására a miRNS expresszióban indukálódó megváltozások megfigyelését mind Northern blot hibridizációval mind *in situ* hibridizációval. Ezek a kísérletek reményeink szerint fontos adatokat fognak nyújtani a vírussal fertőzés és tünet kialakulás hátteréről.



3. Ábra GAPDH mRNS teljes „shut off“-t mutat vírus fertőzött növényekben. Virus fertőzött növényekben megjelenik a GAPD specifikus siRNS. V; vírus fertőzött, M; mock.

Az OTKA támaszámra jelentett közlemények listája.

Havelda, Z., Hornyik, C., Crescenzi, A., and Burgyan, J. (2003) In situ characterization of Cymbidium Ringspot Tombusvirus infection-induced posttranscriptional gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *J Virol* **77**: 6082-6086. **(IF:5.2)**

Havelda, Z., Hornyik, C., Valoczi, A., and Burgyan, J. (2005) Defective interfering RNA hinders the activity of a tombusvirus-encoded posttranscriptional gene silencing suppressor. *J Virol* **79**: 450-457. **(IF:5.2)**

- Simon, A.E., Roossinck, M.J., and **Havelda, Z.** (2004) Plant virus satellite and defective interfering RNAs: new paradigms for a new century. *Annu Rev Phytopathol* **42**: 415-437. (IF:8.3)
- Valoczi, A., Hornyik, C., Varga, N., Burgyan, J., Kauppinen, S., and **Havelda, Z.** (2004) Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res* **32**: e175. (IF:6.5)
- Hornyik, C., **Havelda, Z.**, and Burgyan, J. (2005) Identification of sequence elements of tombusvirus-associated defective interfering RNAs required for symptom modulation. *Arch Virol*. In press. (IF:1.8)